绿盲蝽毒死蜱抗性和敏感品系乙酰胆碱酯酶-2基因的克隆、序列分析及表达水平

左恺然，康照奎，杨亦桦，吴益东，武淑文*

（南京农业大学植物保护学院，南京 210095）

摘要：【目的】为了明确绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 乙酰胆碱酯酶-2（acetylcholinesterase-2，AChE2）与毒死蜱抗性的关系。【方法】本研究利用 RACE 技术获得了绿盲蝽 AChE2 基因（*Al-ace*2）的全长序列，并检测了 *Al-ace*2 在绿盲蝽毒死蜱抗性品系（BZ-R）及敏感品系（SLF 和 BZ）中的氨基酸序列多态性及 mRNA 相对表达量。【结果】*Al-ace*2 开放阅读框长 1 935 bp，编码 644 个氨基酸残基；推导的氨基酸序列含有 AChE 的典型结构，如催化三联体、氧阴离子洞、胆碱结合位点及围绕活性位点丝氨酸的保守结构域 FGESAG。与两个敏感品系（SLF 和 BZ）相比，绿盲蝽毒死蜱抗性品系 BZ-R *Al-ace*2 基因中存在 T552M 氨基酸替换，发生频率为 5%，但此位点氨基酸并不保守，也不靠近活性位点，推测其与抗性无关。在绿盲蝽 SLF，BZ 和 BZ-R 品系中，*Al-ace*1 表达量均约为 *Al-ace*2 的 3 倍，且 *Al-ace*2 转录水平在 3 个品系间无显著差异。【结论】结果说明，在绿盲蝽体内 AChE2 是次要表达的乙酰胆碱酯酶，该 AChE2 可能与绿盲蝽 BZ-R 品系对毒死蜱的抗性无关。

关键词：绿盲蝽；乙酰胆碱酯酶-2；基因克隆；转录水平；毒死蜱；抗药性

中图分类号：Q966 **文献标识码：**A **文章编号：**0454-6296(2016)11-1174-08

Cloning, sequence analysis and expression levels of the acetylcholinesterase-2 gene in the chlorpyrifos-resistant and susceptible strains of *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae)

ZUO Kai-Ran, KANG Zhao-Kui, YANG Yi-Hua, WU Yi-Dong, WU Shu-Wen* (College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract:【Aim】To investigate the relationship between acetylcholinesterase-2 (AChE2) and chlorpyrifos-resistance in *Apolygus lucorum*.【Methods】The AChE2 gene (*Al-ace*2) was cloned using RACE method. The amino acid polymorphism and the transcription level of *Al-ace*2 in the chlorpyrifos-resistant (BZ-R) and susceptible (SLF and BZ) strains of *A. lucorum* were detected.【Results】The *Al-ace*2 gene contains a 1 935 bp open reading frame, which encodes 644 amino acid residues. The deduced amino acid sequence shows the common properties of AChE, such as the catalytic triad amino acids, the characteristic motif 'FGESAG' surrounding the active Ser, oxyanion hole and the choline binding sites. T552M amino acid substitution was only found in *Al-ace*2 in the resistant strain (BZ-R) with the mutation frequency of 5%, but not in the two susceptible strains (SLF and BZ). The amino acid at position 552 is neither conserved nor near to active sites, suggesting that the T552M substitution has much higher possibility to cause polymorphism among individuals than to contribute to chlorpyrifos resistance in *A. lucorum*. The transcription level of *Al-ace*1 was approximately three-fold as high as that of *Al-ace*2 in SLF, BZ and BZ-R strains. The transcription level of *Al-ace*2 showed no significant difference among the three strains.【Conclusion】The results suggest that AChE2 is likely the minor AChE and might not be involved in chlorpyrifos resistance in the BZ-R strain of *A. lucorum*.

Key words: *Apolygus lucorum*; acetylcholinesterase-2; gene cloning; transcription level; chlorpyrifos; pesticide resistance

---

基金项目：国家公益性行业（农业）科研专项（201203038）

作者简介：左恺然，女，1991 年 4 月出生，山东泰安人，博士研究生，研究方向为昆虫分子毒理及抗药性，E-mail：2015202038@njau.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author，E-mail：swwu@njau.edu.cn

收稿日期 Received：2016-08-04；接受日期 Accepted：2016-10-10

乙酰胆碱酯酶（acetylcholinesterase，AChE，EC3.1.1.7）是昆虫神经系统中的关键酶，负责突触部位神经递质乙酰胆碱的水解，同时也是很多有机磷及氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶点。目前除了高等双翅目昆虫蝇类仅有 1 个 AChE，即 AChE2 外（Fournier *et al*., 1989；Walsh *et al*., 2001；Kozaki *et al*., 2001；Chen *et al*., 2001；Vontaset *et al*., 2002），在尖音库蚊 *Culex pipiens*，棉蚜 *Aphis gossypii*，小菜蛾 *Plutella xylostella* 等大多数昆虫体内 AChE 都是由 2 个 *ace* 基因（*ace*1 和 *ace*2）编码的（Gao *et al*., 2002；Li and Han, 2002；Weill *et al*., 2002；Nabeshima *et al*., 2003；Baek *et al*., 2005；Lee *et al*., 2006）。在具有两个 *ace* 基因的昆虫体内，普遍认为 *ace*1 是神经系统主要表达的基因，其表达水平高于 *ace*2（Baek *et al*., 2005；Kim *et al*., 2006；Lee *et al*., 2006, 2007；Seong *et al*., 2012），此外昆虫对有机磷和氨基甲酸酯类的靶标抗性也多与 *ace*1 的突变有关（Russell *et al*., 2004；Oakeshott *et al*., 2005；Kim and Lee, 2013；Sonoda *et al*., 2014）。然而，近年来随着相关研究的深入，对 AChE2 的功能注解正发生变化。AChE2 同样具有水解活性和进行细胞间交流的特质（Grisaru *et al*., 1999；Scholl and Scheiffele, 2003；Russell *et al*., 2004），且在膜翅目、半翅目和鞘翅目等昆虫体内，AChE2 成为主要表达的神经递质水解酶，而 AChE1 却没有活性（Kim and Lee, 2013）。AChE2 在昆虫神经系统中的作用及其与昆虫抗药性的关系需要进一步明确。

由于转 Bt 基因棉花的大面积推广种植，造成棉田害虫治理方式发生一系列变化，导致盲蝽从棉田次要害虫上升成为主要害虫并波及到多种重要作物及蔬菜果树（Lu *et al*., 2008；Bergé and Ricroch, 2010；Li *et al*., 2011）。随着化学防治力度的持续加强，盲蝽对多种杀虫剂均产生了抗药性（Hollingsworth *et al*., 1997；Snodgrass and Scott, 2000；Snodgrass *et al*., 2009；Guo *et al*., 2010；谭瑶等, 2012；刘佳等, 2015）。Wu 等（2015）证实绿盲蝽 *Apolygus lucorum* BZ-R 品系对有机磷杀虫剂毒死蜱的主要抗性机制是由于 AChE1 第 216 位丙氨酸到丝氨酸（A216S）的突变，但文中未能克隆完整的 AChE2 基因序列，氧阴离子洞等重要结构域信息缺失，AChE2 与毒死蜱抗性的关系也待进一步确认。

本研究利用 RACE 技术克隆了绿盲蝽 AChE2 基因（*Al-ace*2）全长，分析了 AChE2 基本序列和重要结构域特点，对比了绿盲蝽毒死蜱抗性品系和敏感品系间 AChE2 的氨基酸差异，同时利用实时定量 PCR 技术测定了 *Al-ace*2 在绿盲蝽 3 个品系中的表达水平。研究结果初步明确了 AChE2 与绿盲蝽毒死蜱抗性的关系，进一步完善了绿盲蝽对毒死蜱的靶标抗性机制。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

绿盲蝽室内敏感品系（SLF）由中国农业科学院植物保护研究所河北廊坊基地提供，在室内人工饲养 45 代以上，期间未接触任何杀虫剂。敏感品系（BZ，对照）于 2009 年 7 月采自山东省滨州市无棣县枣园，在室内人工饲养 30 代以上，期间未接触任何杀虫剂。毒死蜱抗性品系（BZ-R）由 BZ 品系在室内用毒死蜱筛选，每代保持一定的毒死蜱选择压力，至 2015 年 BZ-R 对毒死蜱的抗性倍数达到 130 倍。

饲养条件：温度为 26 ± 1℃，相对湿度为 70% 左右，光周期为 15L∶9D。成虫的主要饲料为四季豆，成虫期饲喂 5% 的蜂蜜水补充营养，供产卵用的四季豆需人为制造一些伤口，卵直接产于四季豆上后收集孵化，若虫的主要饲料为新鲜玉米。

1.2　主要试剂

基因克隆中的主要试剂均购自试剂公司，其中 Invitrogen TRIzol Reagent 购自 Invitrogen；pEASY-Blunt 克隆载体购自 Promega 公司；SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司；M-MLV 反转录酶、dNTP、Ribonuclease Inhibitor、PrimeScript™ RT Reagent Kit 和 SYBR® Premix Ex Taq™ 购自 TaKaRa；Q5 超保真 DNA 聚合酶购自 New England Biolabs。

1.3　RACE 扩增 *Al-ace*2 基因 5′端

参照 Invitrogen TRIzol Reagent（Invitrogen, CA）试剂盒说明提取 5 头 3 – 5 日龄室内敏感品系 SLF 绿盲蝽成虫总 RNA，利用 M-MLV 反转录酶和引物 5′CDS、SMART II A Oligo 合成第一链 cDNA。利用特异性引物（表 1）及以第一链 cDNA 为模板进行 *Al-ace*2 基因缺失的 5′端（Wu *et al*., 2015）第 1 轮扩增。反应体系：10 μL 5 × Q5 缓冲液，1 μL 10 mmol/L dNTPs，1 μL cDNA 模板，UPM 和 ace2-5′race-R1 引物（20 μmol/L）各 1 μL，0.5 μL Q5 DNA 聚合酶，1 μL DMSO，以 H_2O 补足 50 μL。反应程序：98℃ 预变性 30 s，然后 98℃ 变性 10 s，60℃ 30 s，72℃ 2 min，循环 35 次，最后 72℃ 延伸 7 min。

利用特异性引物 UDP、ace2-5′race-R2（表 1）及

以第 1 轮 PCR 产物为模板进行 *Al-ace*2 基因 5′端第 2 轮扩增(表 1)。反应体系及条件同上。所有 PCR 产物利用琼脂糖凝胶电泳纯化,然后与 pEasy-blunt 克隆载体连接,并送至 Invitrogen(上海)公司进行测序。

1.4 克隆 *Al-ace*2 基因 ORF 及序列分析

参照 Invitrogen TRIzol Reagent (Invitrogen, CA) 试剂盒说明提取单头 3 -5 日龄绿盲蝽成虫总 RNA,然后利用 M-MLV 反转录酶和 3′CDS 引物合成 cDNA 第一链。SLF, BZ 和 BZ-R 品系分别制备 20 个 cDNA 样品, -20℃保存备用。

利用特异性引物(表 1)及以第一链 cDNA 为模板克隆 *Al-ace*2 基因的编码区。反应体系及条件同 1.3 节。所有 PCR 产物与 pEasy-blunt 载体连接后送至 Invitrogen(上海)公司测序。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Sequences of primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5′-3′) Primer sequence	目的 Purpose
5′CDS	$(T)_{25}$VN	*Al-ace*2 5′RACE 合成第一链 cDNA
SMART II A Oligo	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG	Synthesis of the 1st strand cDNA in *Al-ace*2 5′RACE
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT + CTAATACGAC TCACTATAGGGC	*Al-ace*2 5′RACE 第 1 轮 PCR
ace2-5′race-R1	TGATGAGATCGGGATCCCCACT	1st round PCR in *Al-ace*2 5′RACE
UDP	AAGCAGTGGT AACAACGCAGAGT	*Al-ace*2 5′RACE 第 2 轮 PCR
ace2-5′race-R2	GCCAGCATCAACCCATCGTAAAC	2nd round PCR in *Al-ace*2 5′RACE
3′CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC$(T)_{30}$VN	*Al-ace*2 ORF 扩增合成第一链 cDNA Synthesis of the 1st strand cDNA in ORF amplification of *Al-ace*2
ace2-orf-F	ATGATGACTGAGTGGGCTGG	*Al-ace*2 开放阅读框扩增
ace2-orf-R	TTACATGGCGACCAGCGCGGCGAG	ORF amplification of *Al-ace*2
ace1-qrt-F	AGACGAGATCAATTACAT	*Al-ace*1 实时定量 PCR
ace1-qrt-R	CAATAGTTCATTATCCTCTT	Amplification of *Al-ace*1 in Real-time PCR
ace2-qrt-F	GGAACAGCTACCCAGGGATT	*Al-ace*2 实时定量 PCR
ace2-qrt-R	CAAATACTTGTCCCGCTGCA	Amplification of *Al-ace*2 in real-time PCR
β-actin-F	ACCTGTACGCCAACACCGT	内参基因 *β-actin* 实时定量 PCR
β-actin-R	TGGAGAGAGAGGCGAGGAT	Amplification of the reference gene *β-actin* in real-time PCR

1.5 *Al-ace*2 基因序列分析

利用 NCBI 网站(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)比对 *Al-ace*2 与其他物种 *ace* 基因碱基序列的相似性并进行鉴定;利用 GENEDOC 软件分析 *Al-ace*2 基因的开放阅读框和核苷酸序列,并比对 SLF, BZ 和 BZ-R 3 个绿盲蝽品系 AChE2 在氨基酸水平上的差异。利用 MEGA 6.0 中的邻位相接法(Neighbor-Joining)构建系统进化树,自举检验(bootstrap test)采用 1 000 次重复。

1.6 实时定量 PCR 检测 *ace* 基因表达水平

参照 Invitrogen TRIzol Reagent 试剂盒说明提取 5 头 3 -5 日龄绿盲蝽成虫总 RNA,并利用 PrimeScript RT Reagent 试剂盒合成第一链 cDNA。SLF, BZ 和 BZ-R 品系分别制备 8 个 cDNA 样品, -20℃保存备用。

利用特异性引物(表 1)及以第一链 cDNA 为模板进行定量 PCR 反应,以 *β-actin*(GenBank 登录号: JN616391)作为内参基因。预先进行扩增效率和融解曲线试验,以确定目标基因和内参基因的引物特异性及扩增效果。反应体系: 2 × SYBR® Premix Ex Taq™ 10 μL, cDNA 模板 2 μL, 10 μmol/L 的正向及反向引物各 0.4 μL, 50 × ROX Reference Dye Ⅱ 0.4 μL,以 H_2O 补足 20 μL。同时以 H_2O 代替 cDNA 模板作为阴性对照。反应程序:95℃预变性 30 s;然后 95℃ 5 s, 60℃ 34 s,循环 40 次;最后添加融解曲线。各 *ace* 基因的相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行计算(Schmittgen *et al*., 2000; Livak and Schmittgen, 2001), C_t 值为每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。

1.7 数据分析

试验数据运用 DPS 12.01 数据处理软件进行统计分析。对不同品系的 *ace* 基因表达量进行单因素方差分析,选用 Duncan 氏新复极差检验法对 *ace* 基因表达量的差异显著性进行多重比较($P<0.05$)。

2 结果

2.1 绿盲蝽 *Al-ace*2 基因序列特点

本研究利用 RACE 技术克隆了绿盲蝽 *Al-ace*2 基因 5′端缺失的序列,获得 *Al-ace*2 基因 cDNA 全长(GenBank 登录号: KX259125)。扩增的 *Al-ace*2 基

```
                                                            AAGCAGTGGTATCAACGCAGA
      GTACATGGGAGTACAAGGTCAACCCCGGCAGGGCGCACACCATCACACCACTCCAGAGGTGATGTAAAGGC
1     ATGATGACTGAGTGGGCTGGGTGCGTGTTGGTGTTGCTGGGCGTGAGCTGGCCGGCGCTGGTGGACTGCAGG
1      M  M  T  E  W  A  G  C  V  L  V  L  L  G  V  S  W  P  A  L  V  D  C  R
73    CCTCACTCTGGGCCCACCTCTGAGAACCCTCACAACCACCAGATCCCACAAGATCCCCTCGTAGTGAAGACG
25     P  H  S  G  P  T  S  E  N  P  H  N  H  Q  I  P  Q  D  P  L  V  V  K  T
145   AGGAGCGGCTACATCCGCGGCTTCTCCAGGACTGCCATGGGACGCGATGTCCACGTATTCTTGGGCGTCCCG
49     R  S  G  Y  I  R  G  F  S  R  T  A  M  G  R  D  V  H  V  F  L  G  V  P
217   TTCGCAAAACCCCCCCTGGGGCCGCTGAGGTTCCGCCGCCCGGTAGCTATGGATCCTTGGTATGGGGTTCAC
73     F  A  K  P  P  L  G  P  L  R  F  R  R  P  V  A  M  D  P  W  Y  G  V  H
289   GACGCTACAATCCTCCCTAACTCCTGTTATCAGGAGCGCTACGAGTACTTCCCGGGGTTCGAGGGGGAGGAG
97     D  A  T  I  L  P  N  S  C  Y  Q  E  R  Y  E  Y  F  P  G  F  E  G  E  E
361   ATGTGGAACCCGAATACTAACATCTCCGAGGACTGCCTCTACCTAAATATTTGGGTTCCTCAGCCAATGAAG
121    M  W  N  P  N  T  N  I  S  E  D  C  L  Y  L  N  I  W  V  P  Q  P  M  K
433   ATGCGCCACCACAACAACGACCTCAAAGAAGAAACGAAACAGAAGCTTCCAGTACTGATATGGATATACGGA
145    M  R  H  H  N  N  D  L  K  E  E  T  K  Q  K  L  P  V  L  I  W  I  Y  G
505   GGTGGATACATGAGTGGTACGGCCACTCTTGACGTTTACGACGGGTTGATGCTGGCGGCCTCTACCGGAGTC
169    G  G  Y  M  S  G  T  A  T  L  D  V  Y  D  G  L  M  L  A  A  S  T  G  V
577   ATCATCGCCTCCATGCAGTACCGAGTCGGTGCTTTCGGGTTCCTGTTCCTGGAACCGCTGCTTTCGCGTGGG
193    I  I  A  S  M  Q  Y  R  V  G  A  F  G  F  L  F  L  E  P  L  L  S  R  G
649   AGTGACGACGCCCCAGGGAACATGGGCCTCTGGGACCAAACGTTGGCCATCAGATGGATCAAAGAGAACATC
217    S  D  D  A  P  G  N  M  G  L  W  D  Q  T  L  A  I  R  W  I  K  E  N  I
721   CACTCCTTCAGTGGGGATCCCGATCTCATCACGTTGTTCGGCGAGTCCGCCGGTGGTGGATCCGTGTCCCTG
241    H  S  F  S  G  D  P  D  L  I  T  L  F  G  E  S  A  G  G  G  S  V  S  L
793   CACTTGATATCACCAGTGACGCGCGGCCTGGTGAGGCGCGGTATCATGCAAAGCGGGACGATCAACGCCCCT
265    H  L  I  S  P  V  T  R  G  L  V  R  R  G  I  M  Q  S  G  T  I  N  A  P
865   TGGAGCTACATGACGGCCGAGCGGGCTCTCGAAATCGGAAAACAGCTCGTGAGCGACTGCTCTTGCAACGCT
289    W  S  Y  M  T  A  E  R  A  L  E  I  G  K  Q  L  V  S  D  C  S  C  N  A
937   TCCCAGCTTCTCGATTCCCCATCCAGAGTCATGGCCTGCATGAGAGGCGTCGACTCCAAGACCATCTCGACG
313    S  Q  L  L  D  S  P  S  R  V  M  A  C  M  R  G  V  D  S  K  T  I  S  T
1009  ATGCAGTGGAACAGCTACTCAGGGATTCTGGGTTTCCCGAGCGCTCCGACCATCGACGGCCATTTTCTCCCG
337    M  Q  W  N  S  Y  S  G  I  L  G  F  P  S  A  P  T  I  D  G  H  F  L  P
1081  AAGGACCCGATGGAGCTCCTCATGGAAGGCGACTTCCCAGAGACGGAAATCCTCATAGGAAGCAACCTCGAC
361    K  D  P  M  E  L  L  M  E  G  D  F  P  E  T  E  I  L  I  G  S  N  L  D
1153  GAAGGAACGTACTTTCTTCTTTACGACTTCATCGATTATTTCTCGAAAGACAACCTCGTCAAGCTGCAGCGG
385    E  G  T  Y  F  L  L  Y  D  F  I  D  Y  F  S  K  D  N  L  V  K  L  Q  R
1225  GACAAGTATTTGGAACTCGTCAACACCATCTTCAAAAATATGACGAAGCTTGAAAGGGAAGCCATTATTTTT
409    D  K  Y  L  E  L  V  N  T  I  F  K  N  M  T  K  L  E  R  E  A  I  I  F
1297  CAATACACGAACTGGGATAACATCGACGACGACATCTTGAACGTGAAACTCATCTCCGATATTGTGGGCGAC
433    Q  Y  T  N  W  D  N  I  D  D  D  I  L  N  V  K  L  I  S  D  I  V  G  D
1369  TATTTCTTCATCTGCCCCACGAACCATTTCGCTGAAAACTTTGCTAAGCACGGCCTCAACGTATATTACTAC
457    Y  F  F  I  C  P  T  N  H  F  A  E  N  F  A  K  H  G  L  N  V  Y  Y  Y
1441  TATTTCATGCAGAGACCCACGACGAGCTTGTGGGGAGAGTGGATGGGCGTTATTCACGGTGACGACATCGGT
481    Y  F  M  Q  R  P  T  T  S  L  W  G  E  W  M  G  V  I  H  G  D  D  I  G
1513  TACGTGTTCGGACATCCGCTCAACATGTCAGTCGCCTACAATGCCCGAGAGAGAGATTTGAGCTTCAGAATG
505    Y  V  F  G  H  P  L  N  M  S  V  A  Y  N  A  R  E  R  D  L  S  F  R  M
1585  ATGGGAGCTTTTGCCAACTTCGCTCACACCGGGAAACCTGGGAACTCGGACGTGAACTGGCCGGCATACACG
529    M  G  A  F  A  N  F  A  H  T  G  K  P  G  N  S  D  V  N  W  P  A  Y  T
1657  AAGAAGGAGCCCCACTACTTTATTTTCCACGCGGAGGATTCTGGTATCGGGCGAGGACCGCGAGCTCCGACC
553    K  K  E  P  H  Y  F  I  F  H  A  E  D  S  G  I  G  R  G  P  R  A  P  T
1729  TGCGCTTTCTGGAATGACTTTTTCCCACGCCTCAAACAACATCAAAGTTGCGACTGCAGTGAGGCTCCAGAC
577    C  A  F  W  N  D  F  F  P  R  L  K  Q  H  Q  S  C  D  C  S  E  A  P  D
1801  TCAGTGAAACTGACGGAACACCTCGACATGATCAATCTGACGAGCGCAGTCAACTTCCCTCTCCCGGCGAAC
601    S  V  K  L  T  E  H  L  D  M  I  N  L  T  S  A  V  N  F  P  L  P  A  N
1873  GCCAGTCCGGCCCAGACGGCCCTCCCGCTCCTCCTCCTTCTCGCCGCGCTGGTCGCCATGTAAGGAAAAAAC
625    A  S  P  A  Q  T  A  L  P  L  L  L  L  L  A  A  L  V  A  M  *
1945  GGCAGTAAGGAAACGGTCAATATAATAATAACGGGAAATAACCATAACACTATCAAAGAAAAAAAAAAAAAA
2017  AAAAAAAAAAAAAAA
```

图 1　绿盲蝽 *ace*2 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *ace*2 in *Apolygus lucorum*

形成催化三联体的氨基酸以黑线框表示；围绕 Ser 的保守结构域 FGESAG 以下划线表示；阴离子结合位点的色氨酸以黑点表示；形成氧阴离子洞的氨基酸以正方形表示；形成酰基口袋的氨基酸以星号表示；形成 3 对二硫键的 6 个半胱氨酸以三角形表示。The amino acids of catalytic triad are boxed, the characteristic motif ‘FGESAG’ surrounding the active Ser is underlined, and the anionic binding site, oxyanion hole, choline binding sites and cysteine pairs forming intra-subunit disulfide bond are marked with dot, squares, stars and triangles, respectively.

因全长 2 123 bp,含 92 bp 的 5′端非翻译区,96 bp 的 3′端非翻译区,1 935 bp 开放阅读框,共编码 644 个氨基酸残基。推导的氨基酸序列含有 AChE 特有的结构,例如:6 个半胱氨酸(第 105 – 132, 310 – 325, 461 – 577 位)形成 3 对二硫键;色氨酸(第 122 位)形成的阴离子绑定位点;丙氨酸(第 257 位)和两个甘氨酸(第 168 和 169 位)组成的氧阴离子洞;苯丙氨酸(第 389 位)、谷氨酸(第 255 位)和两个酪氨酸(第 181 和 388 位)组成的胆碱结合位点;最重要的催化三联体位点丝氨酸(第 256 位),谷氨酸(第 385 位)和组氨酸(第 499 位)以及围绕活性位点 Ser(第 256 位)的保守结构域'FGESAG'(图 1)。

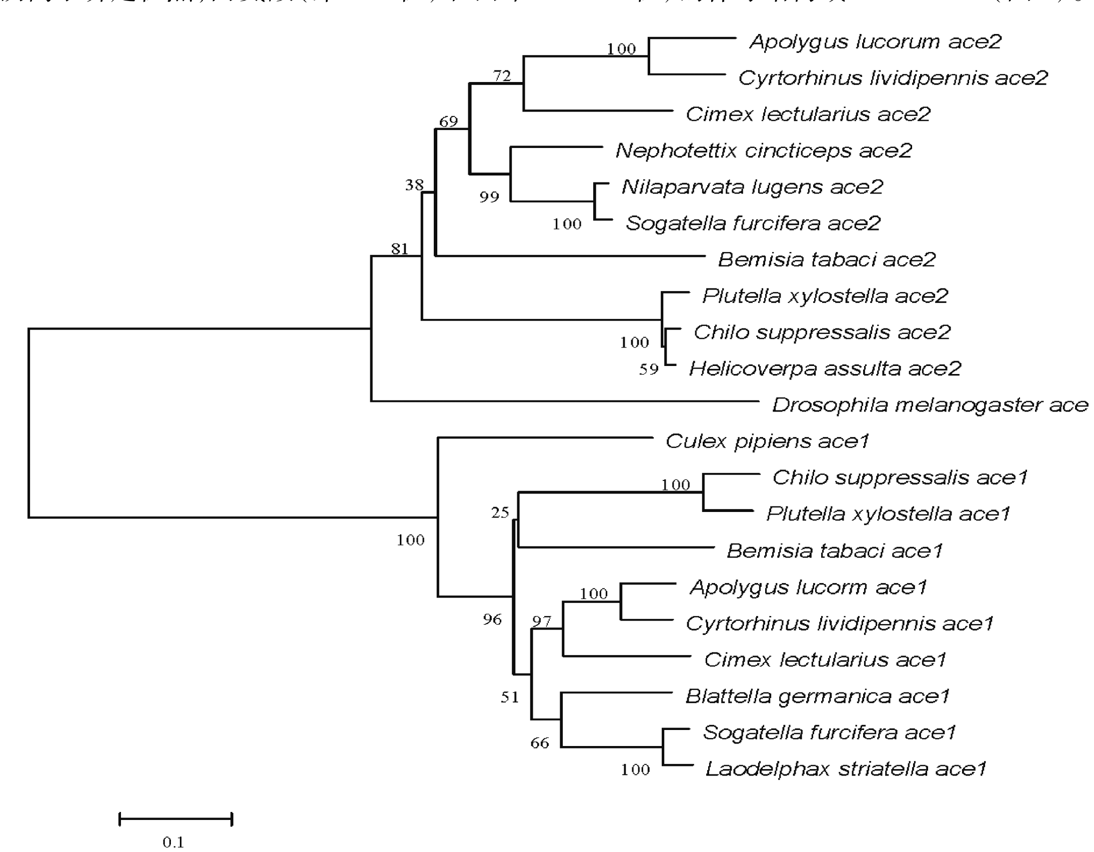


图 2 基于氨基酸序列构建的昆虫 AChE 基因的系统进化分析(邻位相接法)

Fig. 2 Phylogenetic tree of AChE genes in insects based on amino acid sequence (Neighbor-joining method)

AChE 基因序列来源及其 GenBank 登录号 Origin of AChE genes and their GenBank accession numbers: 绿盲蝽 *Apolygus lucorum ace2* (KX259125); 黑肩绿盲蝽 *Cyrtorhinus lividipennis ace2* (KJ174464); 温带臭虫 *Cimex lectularius ace2* (NM_001316706); 黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps ace2* (AB264460); 褐飞虱 *Nilapavata lugens ace2* (JN688930); 白背飞虱 *Sogatella furcifera ace2* (KF895367); 烟粉虱 *Bemisia tabaci ace2* (EF675189); 小菜蛾 *Plutella xylostella ace2* (AY061975); 二化螟 *Chilo suppressalis ace2* (EF470245); 烟青虫 *Helicoverpa assulta ace2* (AY817736); 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster ace* (X05893); 尖音库蚊 *Culex pipiens ace1* (AY762905); 二化螟 *C. suppressalis ace1* (EF453724); 小菜蛾 *P. xylostella ace1* (AY970293); 烟粉虱 *B. tabaci ace1* (EF675187); 绿盲蝽 *A. lucorum ace1* (KR605107); 黑肩绿盲蝽 *C. lividipennis ace1* (KJ174463); 温带臭虫 *C. lectularius ace1* (JN563927); 德国小蠊 *Blattella germanica ace1* (DQ288249); 白背飞虱 *S. furcifera ace1* (KC493656); 灰飞虱 *Laodelphax striatella ace1* (KC470080). 采用邻位相接法构建系统发育树;分支处上方数值表示重复 1 000 次后的自展值(>50%);标尺示遗传距离。Phylogenetic tree is constructed by the neighbor-joining method. Numbers on branches are bootstrap values (>50%) under 1 000 replicates. The scale bar represents the genetic distance.

将 *Al-ace2* 基因的氨基酸序列与 GenBank 中登录的其他昆虫 *ace* 基因序列进行比对(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi),结果表明在氨基酸水平上,*Al-ace2* 与近缘种黑肩绿盲蝽 *Cyrtorhinus lividipennis ace2*(GenBank 登录号: KJ174464)的一致性最高,达到 83%,与黑尾叶蝉 *Nephotellix cincticeps ace2*(GenBank 登录号: AB264460)的一致性为 71%,与白背飞虱 *Sogatella furcifera ace2* (GenBank 登录号: KF895367)的一致性为 70%,与二化螟 *Chilo suppressalis ace2*(GenBank 登录号: EF470245)的一致性为 66%,与烟青虫 *Helicoverpa assulta ace2*(GenBank 登录号: AY817736)的一致性为 65%,与 *Al-ace1*(GenBank 登录号: KR605107)的一致性仅有 39%。系统进化分析的结果表明绿盲蝽 *Al-ace2* 基因与黑腹果蝇 *ace* 基因进化关系较近,与尖音库蚊 *ace1* 基因进化关系较远(图 2),为典型

的Ⅱ型乙酰胆碱酯酶编码基因。

2.2　绿盲蝽 *Al-ace2* 基因的氨基酸多态性

与绿盲蝽 SLF 品系相比，BZ-R 品系 AChE2 有两个多态性位点：第 552 位苏氨酸到蛋氨酸的替换（T552M）和第 577 位半胱氨酸到甘氨酸的替换（C577G）。T552M 替换在 20 头 BZ-R 绿盲蝽中出现 1 次，发生频率为 5%，在与其他物种 AChE2 氨基酸序列比对后发现，其所处位点的氨基酸残基并不保守，也不靠近活性位点，所以 T552M 氨基酸的替换可能是氨基酸多态性而与抗性无关。C577 是 AChE2 形成第 3 对二硫键的半胱氨酸之一，C577G 在 BZ-R 和 BZ 品系中各出现一次，发生频率为 5%，其与 AChE 敏感性的关系尚未见报道，C577G 替换的功能性也需进一步验证。

2.3　绿盲蝽毒死蜱抗性品系和敏感品系中 *Al-ace2* 基因的表达水平

本研究利用荧光定量 PCR 的方法检测了 *Al-ace2* 的相对表达水平（图 3）。结果显示，在 SLF，BZ 和 BZ-R 3 个品系中，*Al-ace1* 的相对表达量均是 *Al-ace2* 的 3 倍左右；*Al-ace2* 相对表达量低，是绿盲蝽神经系统次要表达的胆碱酯酶基因。同时与 SLF 和 BZ 品系相比，BZ-R 品系中 *Al-ace2* 的表达量没有显著差异，表明 *Al-ace2* 的表达水平与绿盲蝽对毒死蜱的抗性无关。

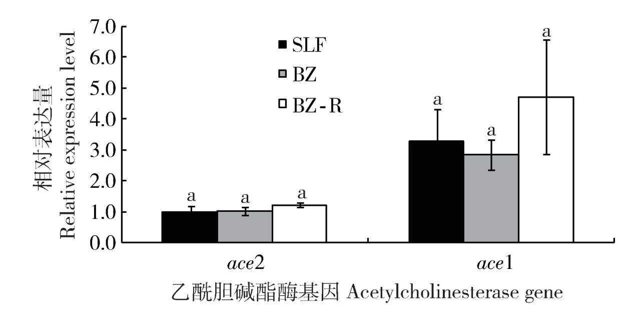


图 3　绿盲蝽毒死蜱抗性品系和敏感品系中 *ace* 基因的相对表达量

Fig. 3　Relative expression level of *ace* genes in chlorpyrifos-resistant and susceptible strains of *Apolygus lucorum*

数据显示为平均值 ± 标准误；柱上相同的小写字母表示同一基因不同品系间表达量差异不显著（Duncan 氏多重比较，$P>0.05$）。Data are shown in means ± *SE*. The same lowercase letters denote that the expression levels of a gene among strains are not significantly different (Duncan's multiple comparison, $P>0.05$).

3　讨论

目前在大部分昆虫体内均发现了两个 AChE 基因的存在，与果蝇 *ace* 同源的命名为 *ace2*，与尖音库蚊 *ace1* 同源的命名为 *ace1*。本研究克隆了绿盲蝽 *Al-ace2* 基因全长，推导的氨基酸序列含有 AChE 的典型结构如催化三联体、氧阴离子洞、胆碱结合位点及围绕活性位点丝氨酸的保守结构域‘FGESAG’，同时绿盲蝽 *Al-ace2* 与黑腹果蝇 *ace* 基因系统进化关系较近，编码典型的Ⅱ型乙酰胆碱酯酶。除高等双翅目昆虫蝇类外，普遍认为在多数昆虫体内 AChE2 不是主要的胆碱酯酶，本研究中绿盲蝽 *Al-ace2* 的表达量低，仅是 *Al-ace1* 表达量的 1/3 左右，在神经系统中也是次要表达的 AChE 基因。但现已有研究表明在包括半翅目在内的 33 个昆虫物种中 AChE2 具有较高的组织表达特异性和酶活性，成为昆虫神经系统中主要表达的水解酶（Kim and Lee, 2013）。昆虫 AChE1 和 AChE2 的系统进化方向及在神经系统中的互作模式尚需进一步深入研究。

乙酰胆碱酯酶是昆虫神经系统中的关键酶，也是有机磷及氨基甲酸酯类杀虫剂的靶标位点，其敏感性下降是昆虫对杀虫剂产生抗药性的主要机制之一。昆虫对有机磷及氨基甲酸酯类杀虫剂的靶标抗性主要与 AChE1 有关。AChE1 通过基因突变（Walsh *et al*., 2001；Vontas *et al*., 2002；Nabeshima *et al*., 2003, 2004；Weill *et al*., 2003；Andrews *et al*., 2004；Baek *et al*., 2005）、基因扩增或是表达水平的改变引起对杀虫剂的抗性（Charpentier and Fournier, 2001；Gao and Zhu, 2002；Baek *et al*., 2005；Sonoda *et al*., 2014）。除双翅目蝇类外，其他昆虫体内 AChE2 与杀虫剂抗性的相关性研究很少。

本研究中 *Al-ace2* 在绿盲蝽毒死蜱抗性品系和敏感品系中的表达量并无显著差异（Wu *et al*., 2015），在氨基酸水平上 *Al-ace2* 也未发现与抗性相关的突变，但并不能因此排除 AChE2 在其他昆虫靶标抗性中的作用。有文献表明，AChE2 基因 W516(435)R 突变与 AChE1 基因 L436(336)S 突变共同作用导致麦蚜对抗蚜威、氧化乐果和久效磷产生了高水平抗性（Chen *et al*., 2007），AChE2 基因 E115L 和 F394L 突变可能导致菜蛾啮小蜂对甲胺磷和敌敌畏等有机磷杀虫剂产生抗性（Zhuang *et al*., 2014）。这些突变也都是围绕着乙酰胆碱酯酶的功能位点发生的，如靠近催化活性位点或是酰基口袋，改变了 AChE2 的三维结构，降低了 AChE2 对杀虫剂的敏感性。这些 AChE2 与杀虫剂抗性的关系尚需深入挖掘，研究结果也必将进一步完善乙酰胆碱酯酶所介导的靶标抗性机理。

参考文献（References）

Andrews MC, Callaghan A, Field LM, Williamson MS, Moores GD, 2004. Identification of mutations conferring insecticide insensitive AChE in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Mol. Biol.*, 13: 555-561.

Baek JH, Kim JI, Lee D, Chung BK, Miyata T, Lee SH, 2005. Identification and characterization of *ace*1-type acetylcholinesterase likely associated with organophosphate resistance in *Plutella xylostella*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 81: 164-175.

Bergé JB, Ricroch AE, 2010. Emergence of minor pests becoming major pests in GE cotton in China. *GM Crops*, 1(4): 214-219.

Charpentier A, Fournier D, 2001. Levels of total acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster* in relation to insecticide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 70: 100-107.

Chen M, Han Z, Qiao X, Qu M, 2007. Resistance mechanisms and associated mutations in acetylcholinesterase genes in *Sitobion avenae* (Fabricius). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 87: 189-195.

Chen Z, Newcomb R, Forbes E, McKenzie J, Batterham P, 2001. The acetylcholinesterase gene and organophosphorus resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 805-816.

Fournier D, Karch F, Bride JM, Hall LM, Bergé JB, Spierer P, 1989. *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene: structure, evolution and mutations. *J. Mol. Biol.*, 210: 15-22.

Gao J, Zhu K, 2002. Increased expression of an acetylcholinesterase gene may confer organophosphate resistance in the greenbug, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 73: 164-173.

Gao JR, Kambhampati S, Zhu KY, 2002. Molecular cloning and characterization of a greenbug (*Schizaphis graminum*) cDNA encoding acetylcholinesterase possibly evolved from a duplicate gene lineage. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 765-775.

Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H, 1999. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *FEBS J.*, 264: 672-686.

Guo TE, Zhang ZQ, Zhou C, Liu F, Mu W, 2010. Susceptibilities of *Lygus lucorum* Meyer-Dür (Hemiptera: Miridae) from five cotton-growing regions in Shandong, China to selected insecticides. *Acta Entomol. Sin.*, 53(9): 993-1000.

Hollingsworth RG, Steinkraus DC, Tugwell NP, 1997. Response of Arkansas populations of tarnished plant bugs (Heteroptera: Miridae) to insecticides and tolerance differences between nymphs and adults. *J. Econ. Entomol.*, 90(1): 21-26.

Kim JI, Jung CS, Koh YH, Lee SH, 2006. Molecular, biochemical and histochemical characterization of two acetylcholinesterase cDNAs from the German cockroach *Blattella germanica*. *Insect Mol. Biol.*, 15: 513-522.

Kim YH, Lee SH, 2013. Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the class Insecta? *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43: 47-53.

Kozaki T, Shono T, Tomita T, Kono Y, 2001. Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 991-997.

Lee DW, Kim SS, Shin SW, Kim WT, Boo KS, 2006. Molecular characterization of two acetylcholinesterase genes from the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta* (Guenée). *Biochim. Biophys. Acta*, 1760: 125-133.

Lee SW, Kasai S, Komagata O, Kobayashi M, Agui N, Kono Y, Tomita T, 2007. Molecular characterization of two acetylcholinesterase cDNAs in *Pediculus* human lice. *J. Med. Entomol.*, 44: 72-79.

Li F, Han Z, 2002. Purification and characterization of acetylcholinesterase from cotton aphid (*Aphis gossypii* Glover). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 51: 37-45.

Li GP, Feng HQ, McNeil JN, Liu B, Chen P, Qiu F, 2011. Impacts of transgenic Bt cotton on a non-target pest, *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür) (Hemiptera: Miridae), in northern China. *Crop Prot.*, 30(12): 1573-1578.

Liu J, Li TT, Huang JM, Kang ZK, Yang YH, Wu YD, Wu SW, 2015. Resistance to beta-cypermethrin and chlorpyrifos in populations of *Apolygus lucorum* from the Yellow and Changjiang River Cotton Growing Areas of China. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 52(3): 616-622. [刘佳，李甜甜，黄家美，康照奎，杨亦桦，吴益东，武淑文，2015. 黄河流域和长江流域棉区绿盲蝽对高效氯氰菊酯和毒死蜱的抗性监测. 应用昆虫学报，52(3): 616-622]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25: 402-408.

Lu YH, Qiu F, Feng HQ, Li HB, Yang ZC, Wyckhuys KAG, Wu KM, 2008. Species composition and seasonal abundance of pestiferous plant bugs (Hemiptera: Miridae) on Bt cotton in China. *Crop Prot.*, 27(3-5): 465-472.

Nabeshima T, Kozaki T, Tomita T, Kono Y, 2003. An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb resistant strains of the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307: 15-22.

Nabeshima T, Mori A, Kozaki T, Iwata Y, Hidoh O, Harada S, Kasai S, Severson DW, Kono Y, Tomita T, 2004. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313: 794-801.

Oakeshott JG, Devonshire AL, Claudianos C, Sutherland TD, Horne I, Campbell PM, Ollis DL, Russell RJ, 2005. Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin- and carboxyl-esterases. *Chem. Biol. Interact.*, 157: 269-275.

Russell RJ, Claudianos C, Campbell PM, Horne I, Sutherland TD, Oakeshott JG, 2004. Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 79: 84-93.

Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW, 2000. Quantitative reverse transcription-polymerase chain

reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal. Biochem.*, 285: 194 - 204.

Scholl FG, Scheiffele P, 2003. Making connections: cholinesterase-domain proteins in the CNS. *Trends Neurosci.*, 26: 618 - 624.

Seong KM, Kim YH, Kwon DH, Lee SH, 2012. Identification and characterization of three cholinesterases from the common bed bug, *Cimex lectularius*. *Insect Mol. Biol.*, 21: 149 - 159.

Snodgrass GL, Gore J, Abel CA, Jackson R, 2009. Acephate resistance in populations of the tarnished plant bug (Heteroptera: Miridae) from the Mississippi River Delta. *J. Econ. Entomol.*, 102 (2): 699 - 707.

Snodgrass GL, Scott WP, 2000. Seasonal changes in pyrethroid resistance in tarnished plant bug (Heteroptera: Miridae) population during a three-year period in the Delta of Arkansas, Louisiana, and Mississippi. *J. Econ. Entomol.*, 93(2): 441 - 446.

Sonoda S, Shi X, Song D, Liang P, Gao X, Zhang Y, Li J, Liu Y, Li M, Matsumura M, Sanada-Morimura S, Minakuchi C, Tanaka T, Miyata T, 2014. Duplication of acetylcholinesterase gene in diamondback moth strains with different sensitivities to acephate. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 48: 83 - 90.

Tan Y, Zhang S, Gao XW, 2012. Monitoring the insecticide resistance of the cotton bugs *Apolygus lucorum* and *Adelphocoris sutrualis*. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 49(2): 348 - 358. [谭瑶, 张帅, 高希武, 2012. 两种盲蝽的抗药性监测. 应用昆虫学报, 49(2): 348 - 358]

Vontas JG, Hejazi MJ, Hawkes NJ, Cosmidis N, Loukas M, Janes RW, 2002. Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Mol. Biol.*, 11: 329 - 336.

Walsh SB, Dolden TA, Moores GD, Kristensen M, Lewis T, Devonshire AL, Williamson MS, 2001. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem. J.*, 359: 175 - 181.

Weill M, Fort P, Berthomieu A, Dubois, MP, Pasteur N, Raymond M, 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc. Biol. Sci.*, 269: 2007 - 2016.

Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, Pasteur N, Philips A, Fort P, Raymond M, 2003. Comparative genomics: insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature*, 423: 136 - 137.

Wu SW, Zuo KR, Kang ZK, Yang YH, Oakeshott JG, Wu YD, 2015. A point mutation in the acetylcholinesterase-1 gene is associated with chlorpyrifos resistance in the plant bug *Apolygus lucorum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 65: 75 - 82.

Zhuang HM, Li CW, Wu G, 2014. Identification and characterization of *ace*2-type acetylcholinesterase in insecticide-resistant and -susceptible parasitoid wasp *Oomyzus sokolowskii* (Hymenoptera: Eulophidae). *Mol. Biol. Rep.*, 41: 7525 - 7534.

（责任编辑：袁德成）